FICHE TECHNIQUE

GELOSE AU CETRIMIDE

DETECTION ET DENOMBREMENT DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BK049HA
BM18408

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose au cétrimide est un milieu sélectif destiné à l'isolement et au dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans les produits biologiques d'origine animale, les produits pharmaceutiques et cosmétiques.
La gélose au cétrimide est conforme à la formule décrite dans les chapitres harmonisés de la Pharmacopée européenne et américaine.

2 HISTORIQUE

La formule du milieu est dérivée de celle du milieu de King A qui favorise la production de pyocyanine par *Pseudomonas aeruginosa.* En 1951, Lowbury préconisa l'utilisation de cétrimide dans un milieu sélectif pour l'isolement des *Pseudomonas*. En raison de l'amélioration de la pureté de l'agent inhibiteur, sa concentration fut réduite par Lowbury et Collins en 1955.

3 PRINCIPES

Le cétrimide (bromure de cétyl-triméthyl-ammonium), composé ammonium quaternaire, agit comme inhibiteur d'une grande variété de germes, y compris les espèces de *Pseudomonas* autres que *Pseudomonas aeruginosa.*

La production de pyocyanine (pigment bleu, non fluorescent, soluble dans l'eau et le chloroforme) est stimulée en présence de chlorure de magnésium et de sulfate de potassium.

Le milieu favorise également la production de pigments fluorescents (pyoverdines) par certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

La plupart des *Pseudomonas aeruginosa* sont identifiables à leur odeur d'aminoacétophénone.

4 PREPARATION

Préparation du milieu déshydraté :

- Mettre en suspension 45,3 g de milieu déshydraté (BK049) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Ajouter 10 mL de glycérol.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

✓ **Reconstitution :**
45,3 g/L
+ 10 mL de glycérol

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

Préparation du milieu en boîtes de Petri :

- Faire fondre le milieu prêt-à-liquéfier (BM184) ou le milieu en flacon préparé à l'avance pendant le temps minimum nécessaire à sa reliquéfaction.
- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47 °C.
- Couler en boîtes de Petri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.
- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.

5 MODE D'EMPLOI

- Après enrichissement, ensemencer l'inoculum en stries à l'aide d'une anse stérile à la surface du milieu ainsi préparé.
- Incuber à 30-35°C pendant 24 heures à 48 heures.

Note : Dans le cadre de la pharmacopée, incuber de 18 heures à 72 heures.

✓ **Ensemencement :**
En surface

✓ **Incubation :**
24 h à 48 h à 30-35 °C

6 LECTURE

Considérer comme suspectes :

- les colonies présentant une pigmentation caractéristique jaune à vert fluo et une fluorescence sous ultra-violets à 254 nm,
- les colonies muqueuses, grisâtres, pigmentées ou non.

Les colonies isolées doivent subir les trois essais de confirmation suivants :

- recherche de l'oxydase par la technique de Kovacs (solution à 1% de chlorhydrate de tétra-méthyl-p-phénylène-diamine),
- production de pyocyanine,
- Culture à 42 °C sur bouillon caséine-soja (BK046).

Un bacille à Gram négatif ayant cultivé sur gélose au cétrimide est considéré comme *Pseudomonas aeruginosa* lorsqu'une colonie typique est caractérisée par les tests suivants :

- Oxydase : positive
- Pyocyanine : positive
- Culture à 42 °C : positive

Occasionnellement, des souches de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia, Alcaligenes* et *Aeromonas* peuvent cultiver en provoquant un léger jaunissement du milieu. Cette coloration se distingue aisément de la production de fluorescéine, car ce jaunissement ne fluoresce pas.

7 FORMULE-TYPE

Cette formule-type peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu (avec glycérol) :

- Peptone pancréatique de gélatine ..... 20,0 g
- Cétrimide ..... 0,3 g
- Chlorure de magnésium ..... 1,4 g
- Sulfate de potassium ..... 10,0 g
- Agar agar bactériologique ..... 13,6 g
- Glycérol ..... 10,0 mL

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,2 ± 0,2.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre blanc-crème, fluide et homogène.

Milieu préparé complet : gélose blanchâtre.

Réponse culturale typique après 48 heures d'incubation à 32,5 °C, inoculum ≤ 100 ufc (Pharmacopée européenne ; NF EN ISO 22717) :

Microorganismes		Croissance théorique (*PR* : Rapport de productivité)
Pseudomonas aeruginosa	WDCM 00026	*PR* ≥ 50 %
Pseudomonas aeruginosa	WDCM 00024	*PR* ≥ 50 %
Pseudomonas aeruginosa	WDCM 00025	*PR* ≥ 50 %
Escherichia coli	WDCM 00013	Inhibée
Staphylococcus aureus	WDCM 00034	Inhibée

9 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C.
Milieu de base préparé en flacons : 6 mois à 2-8 °C (à titre indicatif)*.
Milieu complet préparé en boîtes, avec additif : 1 mois à 2-8 °C, à l'abri de la lumière (à titre indicatif)*.

Milieu en flacons : 2-8 °C.

La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.

10 PRESENTATION

Milieu prêt-à-liquéfier (avec glycérol) :
10 flacons de 100 mL..... BM18408

Milieu de base déshydraté :
Flacon de 500 g BK049HA

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Lowbury, E.J.L., and Collins, A.G., 1955. The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas aeruginosa*., J. Clin. Pathol., 8: 47.

Brown, V.I., and Lowbury, E.J.L. 1965. Use of an improved Cetrimide Agar Medium and of culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Pathol.,18: 752.

Ministère de l'Agriculture. Commission XXX. Cosmétologie. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* dans les produits cosmétiques.

NF EN ISO 22717 (T 75-603). Septembre 2009. Cosmétiques. Microbiologie. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*.

United States Pharmacopeia. Microbial Limit Tests.

Pharmacopée européenne 2.6.13. Contrôle microbiologique des produits non stériles : Recherche de microorganismes spécifiés.

12 AUTRES INFORMATIONS

* Valeur indicative obtenue dans les conditions standards du laboratoire et suivant les instructions du fabricant.

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : BK049_BM184/FR/2003-01 : 6.
Date création : 01-2003
Date de révision : 10-2014
Motif de révision : Révision générale (§ 4 : Préparation ; § 5 : Mode d'emploi ; § 7 : Formule-type ; § 8 : Contrôle qualité, § 10 : Présentation).